

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-333674

(43)Date of publication of application : 05.12.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/02
C07K 16/40
C12N 5/10
G01N 33/573
G01N 33/577

(21)Application number : 11-143681

(71)Applicant : BML INC

(22)Date of filing : 24.05.1999

(72)Inventor : KUJIRAOKA TAKESHI
HATTORI HIROAKI
OKA TOMOICHIRO
IWASAKI TADAO
ISHIHARA MITSUAKI
EGASHIRA TORU

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST PARAOXONASE AND JUDGEMENT OF ARTERIOSCLEROSIS USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a monoclonal antibody specific to paraoxonase and capable of accurately judging arteriosclerosis of a specimen donor by quantitative and qualitative abnormality of paraoxonase in the specimen.

SOLUTION: This monoclonal antibody is specific to a paraoxonase such as a paraoxonase derived from human blood plasma. Furthermore, hybridoma producing the monoclonal antibody is deposited as (i) mouse hybridoma PON 4C-1 (FERM P-17385) and (ii) mouse hybridoma PON5-10D (FERM P-17386) and it is preferable to detect paraoxonase in a specimen by utilizing antigen- antibody reaction between the monoclonal antibody and paraoxonase in the specimen such as blood specimen and judge arteriosclerosis of a specimen donor by using quantitative and qualitative abnormality of paraoxonase in the detected specimen as index.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.04.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-333674

(P2000-333674A)

(43) 公開日 平成12年12月5日 (2000.12.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード* (参考)
C 1 2 N 15/02		C 1 2 N 15/00	C 4 B 0 2 4
C 0 7 K 16/40		C 0 7 K 16/40	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10		G 0 1 N 33/573	A 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/573		33/577	B
33/577		C 1 2 N 5/00	B

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願平11-143681

(22) 出願日 平成11年5月24日 (1999.5.24)

(71) 出願人 591083336

株式会社ビー・エム・エル

東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号

(72) 発明者 鯨岡 健

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ

ー・エム・エル総合研究所内

(72) 発明者 服部 浩明

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ

ー・エム・エル総合研究所内

(74) 代理人 100103160

弁理士 志村 光春

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パラオキシナーゼに対するモノクローナル抗体及びこれを用いる動脈硬化の判定方法

(57) 【要約】

【課題】パラオキシナーゼに関連した、優れた動脈硬化の判定手段を見出すこと。

【解決手段】①パラオキシナーゼに対するモノクローナル抗体、②このパラオキシナーゼに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、③このパラオキシナーゼに対するモノクローナル抗体と、検体中のパラオキシナーゼとの間における抗原抗体反応を利用する、検体中のパラオキシナーゼの検出方法及び④この検出方法により検出された検体中のパラオキシナーゼの異常により、検体提供者の動脈硬化を判定する方法を提供することにより、上記の課題を解決し得ることを見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】パラオキシナーゼに対するモノクローナル抗体。

【請求項2】パラオキシナーゼが、ヒトの血漿に由来するパラオキシナーゼである、請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項4】請求項1又は2のモノクローナル抗体と、検体中のパラオキシナーゼとの間における抗原抗体反応を利用する、検体中のパラオキシナーゼの検出方法。

【請求項5】検体が血液検体である、請求項4記載の検出方法。

【請求項6】請求項4又は5記載の検出方法により検出された検体中のパラオキシナーゼの量的・質的な異常を指標として、検体提供者の動脈硬化を判定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、モノクローナル抗体及びこれを用いた検体中の疾病に関する情報を検出する検出方法に関する技術分野の発明である。より具体的には、本発明は、パラオキシナーゼについての、前記技術分野の発明である。

【0002】

【従来の技術】低密度リポ蛋白質（LDL）あるいはその酸化修飾されたリポ蛋白質は動脈硬化症発症の引き金となり、また動脈硬化症を促進することで冠動脈疾患（CAD）へ進展させると考えられている。このような観点から、血中のLDLコレステロールの上昇は、冠動脈疾患の進展に対する優れた指標であると考えられ、数多くの食事指導、あるいは薬剤などによるLDLコレステロールを低下させる臨床治験が試みられ、その結果、LDLを低下させることが冠動脈疾患の低下につながるという多くの証拠が得られている。最近では、4S（Scandinavian Simvastatin Survival Study）の臨床治験においてCADを有する高コレステロール血症者における30%のCAD発症の危険度をCADによる死亡から42%減少させているという結果が得られている。また、プラバスタチンを服用している高コレステロール血症患者を対象としたWOSCOPS（West of Scotland Coronary Prevention Study）、あるいはロバスタチンを服用している境界領域の高コレステロール血症患者を対象としたAFCAPS/TexCAPS（the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study）においては、両治験とも、血中のLDLを減少させる上記の薬剤が、冠動脈疾患の素因を減少させていることが示されている。その他、多くのLDLを低下させる薬剤の単独並びに併用による、冠動脈撮影による臨床治験においては、冠動脈肥厚の変化はわずかであるにもかかわらず、CAD発症の著明な改善が示されてい

る。

【0003】

【発明が解決すべき課題】上述したように、HMG-CoA還元酵素阻害剤を代表とするスタチン系薬剤により、CADの発症は約1/3に減少したことが示されたわけである。しかしながら、このことは逆に、残り約2/3は薬剤を服用しているにもかかわらずCADの危険にさらされていることになる。このことは、未知の、発見されていない冠動脈疾患のリスクファクター、例えば、高血圧症、喫煙、糖尿病、肥満、低HDLコレステロール血症等に挙げられるその他のリスクファクターの、冠動脈疾患の発症における関与がさらに浮き彫りにされたことになる。また、これら血中コレステロールを低下させる薬剤は、肝臓あるいは末梢組織でのコレステロールの取り込みを亢進させ、あるいは腸管からの胆汁の吸収を抑制することにより、血中コレステロールを低下させる薬剤である。それゆえ、血中での余剰のコレステロールを低下させて、生体内、ひいては血中でのLDLに対する酸化ストレスによる影響を、上記の血中コレステロールを低下させる薬剤の使用により緩和することは可能ではあるが、これを完全に排除したわけではない。すなわち、その血中濃度を低下させたといっても、血中に循環しているLDLは、依然、酸化ストレスの標的であることには変わりはない。

【0004】また、動脈硬化層のコレステロールの蓄積は、末梢組織間において酸化修飾されたLDLである「酸化LDL」が、マクロファージあるいは平滑筋内膜の細胞にスカベンジャー受容体を介して取り込まれることによると考えられている。このような観点から、血中における酸化LDLを測定することが、動脈硬化の発症、および進展を知る上で重要と考えられる。しかしながら、かかる酸化LDLは末梢で酸化され、速やかにマクロファージに取り込まれることから、血中には、このような酸化LDLは存在しないか、あるいは極めて微量で存在するに過ぎないと考えられる。

【0005】一方、高密度リポ蛋白質（HDL）は、肝以外の末梢組織よりフリーコレステロールを引き抜き、引き抜いたコレステロールを、肝臓へ運ぶ役割をしていることが知られている。すなわち、HDLは、コレステロール逆転送系の主な役割を担っており、末梢組織でのコレステロールの蓄積に拮抗的に働き、生体内では抗動脈硬化的に作用していることが知られている。しかしながら、HDLの代謝については、明確には解明されておらず、どのようにHDLが生体内で抗動脈硬化的に作用しているのかは未だ明らかにされていない。

【0006】近年、HDLの抗酸化作用は、HDLを構成している蛋白成分、例えば、アポ蛋白A1、LCAT、パラオキシナーゼ、PAF-AH、CETP、PLTP、アポ蛋白J等に起因していることが提唱されている。とりわけ、パラオクソン、有機リン、神

経ガスのサリンなどのaromatic carboxylic acidを加水分解する血清酵素であるパラオキシナーゼについては、近年抗動脈硬化作用が示されている(Mackness, et al., Curr Opin Lipidol, 1996;7:69-76)。さらに、パラオキシナーゼは抗酸化作用を有するHDL結合蛋白であり、酸化修飾により、動脈硬化を促進する炎症性の分子を破壊することにより、CADへのリスクを軽減しているという報告がある(Heinecke, et al., Am J Hum Genet, 1998;62:20-24)。

【0007】また、ヒトのパラオキシナーゼの遺伝子は、第7染色体の長腕q21-q22に局在し、血中のパラオキシナーゼ活性は広範囲にわたることが示されており、これはパラオキシナーゼの192番目にコードされているアミノ酸の多型(Gln/Arg)によるものであることが知られている。前記の192番目のアミノ酸がグルタミンであるAタイプは、パラオキシナーゼ活性が低く、アルギニンであるBタイプは、同活性が約8倍高い。

【0008】HDL結合パラオキシナーゼが、銅イオンによるLDLの酸化を阻害すること(Mackness, et al., FEBS Lett, 1991;286:152-154)、これはHDLがLDLの酸化を阻害することにより動脈硬化へのリスクを軽減しているという仮説を裏付ける事実である。また、パラオキシナーゼが酸化修飾されたLDLの酸化リン脂質を取り除く作用を有するという報告もなされている(Watson, et al., J Clin Invest, 1995;96:2882-2891)。BタイプのパラオキシナーゼとCADの関連性について多くの報告があるが、これは、パラオキシナーゼ活性の高いBタイプの頻度がAタイプの頻度と比較して、CHDにおいて高いことと関連している。さらに、ジーンターゲットングにより作出したパラオキシナーゼ欠損マウスは、細菌毒素に対して感受性であり、このマウスから分離されたHDLはLDL酸化に対して抗酸化作用を示さず、野生型マウスに比して動脈硬化を発症しやすいことが報告されている(Shih, et al., Nature, 1998;394:284-287)。

【0009】上述したごとく、パラオキシナーゼが、生体内において抗酸化作用を発揮することが推測されており、パラオキシナーゼが生体内で生じる酸化ストレスに対し、予防的に働き消費されるのであれば、その活性と蛋白量を測定すれば、生体内の酸化ストレス、さらには動脈硬化のレベルを知ることが可能となる。

【0010】パラオキシナーゼの蛋白定量系については、Kawaiらのモノクローナル抗体を用いたELISA法による定量法が報告されている(Clin Chim Acta, 1991;202:219-226)。しかしながら、彼らの用いたモノクローナル抗体は、血漿より精製したアリルエステラーゼ活性を有する蛋白に対するモノクローナル抗体であり、その蛋白の精製品における詳細な記載は認められない。また、疾患との関連性も、肝硬変を患った患者群

と健常者との比較を示したのみであり、血清パラオキシナーゼが、肝臓で合成されることを考えると、かかる臨床検査は、動脈硬化症との関連性は極めて薄い。また、最近、Blatter-GarinらのELISA法(Blatter-Garin, et al., Biochem J, 1994;304:549-554)は、パラオキシナーゼに対する一種類のモノクローナル抗体を用いた競合ELISA法による測定系であり、特異性、再現性、感度の点で信頼性に乏しい面があることは否めない。

【0011】そこで、本発明において解決すべき課題は、パラオキシナーゼに関連した、優れた動脈硬化の判定手段を見出すことである。

【0012】

【課題を解決するための手段】この課題を解決するために、本発明者は、ヒト血漿に存在するパラオキシナーゼを単離・精製し、この精製パラオキシナーゼを免疫抗原とするモノクローナル抗体を製造し、このモノクローナル抗体に基づく抗原抗体反応を利用した、パラオキシナーゼの検出方法を利用することにより、的確に被検者の動脈硬化を判定することが可能であることを見出し、本発明を完成した。

【0013】すなわち、本発明者は、①パラオキシナーゼに対するモノクローナル抗体(以下、本発明モノクローナル抗体ともいう)、②本発明モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ(以下、本発明ハイブリドーマともいう)、③本発明モノクローナル抗体と、検体中のパラオキシナーゼとの間における抗原抗体反応を利用する、検体中のパラオキシナーゼの検出方法(以下、本発明検出方法ともいう)及び④本発明検出方法により検出された検体中のパラオキシナーゼの量的・質的な異常を指標として、検体提供者の動脈硬化を判定する方法(以下、本発明判定方法ともいう)を提供する。

【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。

A. 本発明モノクローナル抗体ないし同ハイブリドーマ: 本発明モノクローナル抗体は、上述のように、パラオキシナーゼに対するモノクローナル抗体である。

【0015】このようなモノクローナル抗体を得るための前提条件として、適切な免疫抗原を選択して用いることが必要である。本発明においては、免疫抗原として、ヒトに由来するパラオキシナーゼを用いることが好ましい。具体的には、例えば、ヒトの血漿に由来するパラオキシナーゼを精製して用いることが、本発明検出方法においては、血液検体を特に好適に用いる点及び単離・精製操作が比較的簡便である等の点において好ましい。

【0016】血漿からのパラオキシナーゼの単離・精製は、公知の方法、例えば、Ganらの方法(Gan, et al., Drug Metabolism and Disposition, 19:100-106, 1991: 具体的には、後述する)に従って行うことができ

る。

【0017】また、免疫抗原として、タンパク質工学的な手法を用いて得られる、組換えパラオキシナーゼを、本発明において用いることも可能である。かかる組換えパラオキシナーゼは、既に知られているパラオキシナーゼ遺伝子の塩基配列 (Hassett, et al., Biochemistry, 30, 10141, 1991) を基にして、常法、例えば、PCR法等の遺伝子増幅法を、ヒトのゲノムDNAに直接施すことにより、所望するパラオキシナーゼ遺伝子を入手することが可能である。

【0018】すなわち、ゲノムDNAを鋳型とし、パラオキシナーゼ遺伝子の5'末端側と3'末端側の配列を含むDNA断片をプライマーとして、PCR法等の遺伝子増幅法により、パラオキシナーゼ遺伝子を大量に増幅して入手することもできる。

【0019】さらに、ホスファイトートリエステル法 (Ikehara, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 5956 (1984)) 等の、通常公知の方法を用いて、パラオキシナーゼ遺伝子を化学合成することも可能であり、このような化学合成法を応用したDNAシンセサイザーを用いて、パラオキシナーゼ遺伝子を合成することもできる。

【0020】上述のようにして入手され得るパラオキシナーゼ遺伝子を用いて、本発明モノクローナル抗体として用い得る、組換えパラオキシナーゼを、一般的な遺伝子組換え技術に従って製造することができる。

【0021】より具体的には、パラオキシナーゼ遺伝子が、発現可能な形態の遺伝子発現用ベクターに、パラオキシナーゼ遺伝子を組み込み、この遺伝子発現用ベクターの性質に対応する宿主に、この組換えベクターを導入して形質転換し、この形質転換体を培養等することにより、所望するパラオキシナーゼを製造することができる。

【0022】本発明モノクローナル抗体の免疫抗原としては、上述のようにして得られるパラオキシナーゼの全部又は一部を用いることができる。また、例えば、パラオキシナーゼの一部を抗原決定基として用いる場合のように、用いるパラオキシナーゼが小分子の場合には、必要に応じてハプテンに結合したパラオキシナーゼを免疫抗原とすることも可能である。

【0023】本発明モノクローナル抗体を製造するために、上述のようにして得られる免疫抗原で免疫される動物も、特に限定されるものではなく、マウス、ラット等を広く用いることが可能であり、細胞融合に用いる骨髓腫細胞との適合性を考慮して選択することが望ましい。

【0024】免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を免疫の対象とする動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内等で投与することにより行うことができる。より、具体的には、上記免疫抗原を所望により通常のアジュバントと併用して、免疫の対象とする動物に、2週間程度毎に、上記手法により数回投与し、本発明モノクローナ

ル抗体製造のための免疫細胞、例えば免疫後の脾臓細胞を得ることができる。

【0025】モノクローナル抗体を製造する場合、この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髓腫細胞としては、既に公知のもの、例えばSP2/O-Ag14, P3-NS1-1-Ag4-1, MPC11-45, 6, TG1.7 (以上、マウス由来); 210.RCY, Ag1.2, 3 (ラット由来); SKO-007, GM15006TG-A12 (以上、ヒト由来) 等を用いることができる。

【0026】上記免疫細胞とこの骨髓腫細胞との細胞融合は、通常公知の方法、例えばケーラーとミルシュタインの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Nature, 256, 495 (1975)) 等に準じて行うことができる。

【0027】より具体的には、この細胞融合は、通常公知の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (PEG) 又はセンダイウイルス (HVJ) 等の存在下において、融合効率を向上させるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。

【0028】所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン) 培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行うことができる。このようにして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とするモノクローナル抗体の検索及び単クローン化に供することができる。

【0029】目的とするモノクローナル抗体産生株の検索は、例えばELISA法、プラーク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー法、RIA法等の一般的な検索法に従い行うことができる。

【0030】このようにして得られるパラオキシナーゼを認識する本発明モノクローナル抗体を産生する本発明ハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、さらに液体窒素中で長時間保存することもできる。

【0031】本発明ハイブリドーマからの本発明モノクローナル抗体の採取は、このハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこのハイブリドーマに適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いることができる。

【0032】なお、インビトロで免疫細胞をパラオキシナーゼ又はその一部の存在下で培養し、一定期間後に上記細胞融合手段を用いて、この免疫細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを調製し、抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることで本発明モノクローナル抗体を

得ることもできる (Reading, C.L., J. Immunol. Meth., 53, 261(1982); Pardue, R.L., et al., J. Cell Biol., 96, 1149(1983))。

【0033】また、上記のようにして得られるモノクローナル抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。

【0034】このようにして得られる本発明モノクローナル抗体は、パラオキシナーゼに特異反応性を有する抗体である。なお、この「パラオキシナーゼに特異反応性を有する」とは、本発明モノクローナル抗体は、少なくとも、ヒトのパラオキシナーゼに対しては交差反応性を示すという意味である。

【0035】このような性質の本発明モノクローナル抗体は、後述するように、臨床において用い得ることは勿論のこと、パラオキシナーゼ自体の分離・精製のための試薬としても極めて有用である。

【0036】本発明モノクローナル抗体についてのさらに具体的な内容は、実施例において後述する。このようにして得られる本発明モノクローナル抗体を、必要に応じて標識物質で標識して、後述する本発明に係わる測定方法等において用いることができる。

【0037】かかる標識物質は、その標識物質単独で又はその標識物質と他の物質とを反応させることにより、検出可能なシグナルをもたらす標識物質であり、具体的には、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、アルコール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ペニシリナーゼ、カタラーゼ、アポグルコースオキシダーゼ、ウレアーゼ、ルシフェラーゼ若しくはアセチルコリンエステラーゼ等の酵素、フルオレスセインイソチオシアネート、フィコビリタンパク、希土類金属キレート、ダンシルクロライド若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート等の蛍光物質、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^3H 等の放射性同位体、ビオチン、アビジン若しくはジゴケシゲニン等の化学物質、又は化学発光物質等を挙げることができる。

【0038】これらの標識物質による、本発明モノクローナル抗体の標識方法は、選択すべき標識物質の種類に応じて、既に公知となっている標識方法を適宜用いることができる。

【0039】また、本発明モノクローナル抗体（標識されたものを含む）を、不溶性担体に固定化した、固定化モノクローナル抗体として、後述する本発明に係わる測定方法等に用いることもできる。

【0040】さらに、本発明モノクローナル抗体は、必要に応じて、不溶性担体に固定化して用いることができる。かかる不溶性担体としては、抗体の不溶性担体として既に用いられている各種の不溶性担体を用いることが

できる。具体的には、例えば、マイクロプレートに代表されるプレート、試験管、チューブ、ビーズ、ボール、フィルター、メンブレン、あるいはセルロース系担体、アガロース系担体、ポリアクリルアミド系担体、デキストラン系担体、ポリスチレン系担体、ポリビニルアルコール系担体、ポリアミノ酸系担体、あるいは多孔性シリカ系担体等のアフィニティークロマトグラフィーにおいて用いられる不溶性担体等が挙げられる。

【0041】これらの不溶性担体における、本発明モノクローナル抗体の固定化方法は、各種の不溶性担体において既に確立している抗体の固定化方法を、選択すべき不溶性担体の種類に応じて、適宜選択することができる。

【0042】B. 本発明検出方法：本発明検出方法は、上述したように、本発明モノクローナル抗体と、検体中のパラオキシナーゼとの間における抗原抗体反応を利用する、パラオキシナーゼの検出方法である。

【0043】このような本発明検出方法の様態としては、例えばエンザイムイムノアッセイ法、ラジオイムノアッセイ法、フルオロメトリーによる解析、ウエスタンブロット法等を挙げることができるが、一般的には、エンザイムイムノアッセイ法による解析による方法を選択することが望ましい。エンザイムイムノアッセイ法は、酵素免疫定量法ともいい、標識イムノアッセイ法のうち、酵素を標識物質として用いる検出方法である。エンザイムイムノアッセイ法には、いわゆるB/F分離を必要とする“heterogeneous enzyme immunoassay”と、このB/F分離を必要としない“homogeneous enzyme immunoassay”とに大別される。本発明検出方法においては、これらのうち、一般的に測定感度が高いといわれる、前者の“heterogeneous enzyme immunoassay”を選択することが好ましく、イムノソルベントを用いる、“enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)”を選択することがさらに好ましい。

【0044】より具体的な検出態様として、いわゆるサンドイッチ法によるエンザイムイムノアッセイ法（以下、サンドイッチ法ともいう）を例示することができる。かかるサンドイッチ法は、特に、操作上の簡便性、経済上の利便性、とりわけ臨床検査としての汎用性を考慮すると、特に好ましい検出態様の一つである。

【0045】このサンドイッチ法を行うに際しては、本発明モノクローナル抗体が、96穴マイクロプレートに代表されるような、多数のウェルを有するマイクロプレートに固定化された、固定化モノクローナル抗体と、西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素又はビオチンにより標識された、本発明モノクローナル抗体を用いることが好ましい。

【0046】サンドイッチ法は、少なくとも、下記(a)及び(b)の工程を含む、エンザイムイムノアッセイ法である。

(a) 不溶性担体に、本発明モノクローナル抗体を固定化した、固定化モノクローナル抗体に、血液検体等の検体を反応させる工程。

【0047】この工程(a)においては、通常は、反応後、用いたマイクロプレートを洗浄し、未反応の検体は、固定化モノクローナル抗体から除去される。

(b)固定化モノクローナル抗体と、試料中のパラオキシソナーゼとの結合により形成される、抗原抗体複合体に、西洋ワサビペルオキシダーゼやビオチン等により標識された本発明モノクローナル抗体を反応させる工程。

【0048】この工程(b)においては、通常は、反応後、用いたマイクロプレートを洗浄し、未反応の標識された本発明モノクローナル抗体は、固定化モノクローナル抗体から除去される。

【0049】また、この工程(b)においては、反応させた第2抗体における標識物質の種類に応じた標識シグナルの発現手段を用いて、標識シグナルを顕在化させることができる。例えば、標識物質としてビオチンを選択した場合には、アビジンやストレプトアビジンを用いて、標識シグナルを顕在化させることができる。また、例えば、標識物質として、西洋ワサビペルオキシダーゼを選択した場合には、その基質を必要に応じて発色物質と共に添加して、標識シグナルを顕在化することができる。

【0050】このようにして、顕在化した発色シグナルを、その発色シグナルの種類に応じた、シグナルの特定手段を用いて検出することで、所望する検体中のパラオキシソナーゼの検出を行うことができる。

【0051】なお、本発明検出方法において用いられる検体は、本来、パラオキシソナーゼが存在する検体であれば特に限定されないが、後述する本発明判定方法が、動脈硬化について判定する方法であることや、本発明の臨床検査としての適応等を考慮すると、血漿等の血液検体であることが好ましい。

【0052】本発明検出方法の検出対象である、検体中のパラオキシソナーゼ量は、被検者の動脈硬化の進展度合いの有力な指標となる。すなわち、本発明検出方法により検出された検体中のパラオキシソナーゼの異常により、検体提供者の動脈硬化を判定する、本発明判定方法が提供される。

【0053】本発明判定方法においては、動脈硬化が進展していなければ、検体中のパラオキシソナーゼ量が正常値($80 \pm 25 \mu\text{g} / \text{ml}$ 程度)であるが、動脈硬化が進展している場合には、生体が動脈硬化に際しての過酷な酸化ストレスに対抗するために、パラオキシソナーゼが大量に消費されてしまうことになり、量的に低値を示すか、あるいは質的に異常を示すかによって、動脈硬化の判定がなされる。

【0054】すなわち、本発明判定方法においては、本発明検出方法を用いて、血液検体等の検体中のパラオキシソナーゼ量が、正常値よりも少ないか、又は質的に異な

れば、動脈硬化の進展が認められることを判定可能であり、本発明判定方法で、「動脈硬化陽性」と判定された検体提供者に対して、具体的な症状、例えば、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞等が現れる前に、適切な処置を行うことが可能であり、極めて、予防医学上、有用な方法である。なお、本発明判定方法の有用性については、後述する実施例において、具体的に述べる。

【0055】本発明においては、本発明モノクローナル抗体を、本発明判定方法(本発明検出方法を含む)において用いるための、本発明モノクローナル抗体を含む動脈硬化判定用キットも提供される〔以下、本発明判定用キット(本発明検出用キット)という〕。

【0056】本発明判定用キットにおいては、本発明モノクローナル抗体を、検体中のパラオキシソナーゼの異常の検出のために供するための要素、例えば、前記の標識された本発明モノクローナル抗体や固定化された本発明モノクローナル抗体等が含まれ得る。

【0057】本発明判定用キットも、上述した本発明判定方法(本発明検出方法)に対応して、サンドイッチ法やフルオロメトリーによる判定や検出を容易に行い得る構成のキットであることが好ましい。

【0058】

【実施例】以下、本発明を実施例を用いて具体的に説明するが、この実施例は、本発明の技術的範囲を限定解釈するべきものではない。

パラオキシソナーゼ活性測定法

パラオキシソナーゼ活性測定はEckersonらの方法(Am J Hum Genet, 35:214-227, 1983)に準じて行った。すなわち、1.0mM paraoxon (シグマ社製)の基質を添加した1.0mM CaCl_2 含有50mMグリシン緩衝液(pH 10.5)0.2mlの反応液に10 μl の予めPBSにて10倍に希釈した血清、あるいは精製分画を加え、25℃の条件下で酵素の加水分解により生じるp-ニトロフェノールの遊離を分光光度計にて波長 $\lambda = 412\text{nm}$ の吸光度の増加を経時的に測定した。血清および検体のパラオキシソナーゼ活性は試料中のパラオキシソナーゼ活性からバックグラウンド(非酵素学的反応により分解され遊離されるp-ニトロフェノール)を差し引いた活性をパラオキシソナーゼ活性とした。パラオキシソナーゼ活性1Uは1分間に1nmolのp-ニトロフェノールを遊離する酵素活性と定義される。

【0059】アリルエステラーゼ活性測定法

アリルエステラーゼ活性測定は、Eckersonらの方法(Am J Hum Genet, 35:214-227, 1983)に準じて行った。すなわち、1mM phenylacetate (和光純薬社製)を添加した1.0mM CaCl_2 を含む20mM トリス緩衝液(pH 8.0)0.2mlの反応液に10 μl の予めPBSにて100倍に希釈した血清、あるいは精製分画を加え、25℃の条件下で酵素の加水分解により生じるフェノールの遊離を分光光度計にて、波長 $\lambda = 270\text{nm}$

の吸光度の増加を経時的に測定した。血清および検体のアリルエステラーゼ活性は、試料中のアリルエステラーゼ活性からバックグラウンド（非酵素学的反応により分解され遊離されるフェノール）を差し引いた活性をアリルエステラーゼ活性とした。アリルエステラーゼ活性1Uは1分間に1 μ mol の phenylacetate を加水分解する酵素活性と定義される。

【0060】パラオキシナーゼの精製

血漿からのパラオキシナーゼの精製はGanらの方法（Drug Metabolism and Disposition, 19:100-106, 1991）に準じて行った。すなわち、2種類の樹脂ブルーアガロースCibacron blue F3GA-agarose（シグマ社製）、および陰イオン交換樹脂DEAEイオン交換樹脂（ファルマシア社製）を用いた3ステップによる方法を用いて、パラオキシナーゼの精製を行った。

【0061】ブルーアガロースクロマトグラフィー
400mlの血漿に、4mlの1.0M CaCl_2 を加え、終濃度1.0mMとした。室温にて2時間攪拌後、血漿を、4℃、5000g、20分間遠心分離し、フィブリン塊を取り除いた。次いで、400mlの血漿に対し予め3M NaCl含有カラムバッファー（1.0M CaCl_2 、および5 μ M EDTA含有50mMトリス緩衝液、pH8.0）にて平衡化した400mlのブルーアガロース（Cibacron blue F3GA-agarose）と室温にて混和し、3M NaCl含有カラムバッファーを加え全量を2Lとし、室温で混和した。次いで、ブルーアガロースゲルに結合したパラオキシナーゼを汚紙（No. 3、ワットマン社製）を装着したブチャーファネル（井内盛栄堂社製）で、全量をろ過した。さらに、600mlの3M NaCl含有カラムバッファーで5回洗浄した。洗浄後、ブルーアガロースゲルを600mlのカラムバッファーにて2回洗浄した。洗浄後、ブルーアガロースゲルのスラリーをカラム（2.6×40cm、ファルマシア社製）にカラムバッファーを用いて充填した。次いで、0.1%デオキシコーレート含有カラムバッファーにてパラオキシナーゼを溶出した。溶出フラクションは各々10mlずつチューブに分取した。分取した各フラクションの蛋白濃度（280nmの吸光度）、およびパラオキシナーゼ活性を上掲のごとく測定した。その結果、フラクションNo. 24～No. 30の画分に蛋白とパラオキシナーゼ活性が認められた（第1図）。このようにして得られたパラオキシナーゼ活性が認められる分画No. 24～No. 30のフラクションをまとめてパラオキシナーゼのブルーアガロース分画とした。

【0062】イオン交換クロマトグラフィー

上述のごとく得られたブルーアガロース分画に同等量の0.2%Nonidet P-40（ナカライテスク社製）含有トリスバッファー（1M CaCl_2 、40%グリセロール、および5 μ M EDTA含有25mM Tris/HCl、pH8.0）を加え、混和した。さらに、予め

0.1%Nonidet P-40含有トリスバッファー（1M CaCl_2 、20%グリセロール、および5 μ M EDTA含有25mM Tris/HCl、pH8.0）で平衡化した陰イオン交換樹脂DEAEセファロース（ファルマシア社製）を等量加え、混和した。この懸濁液を、50mlのファルコンチューブに移し、低速にて遠心分離し、上清を捨てる。さらに、DEAEセファロースに0.1%Nonidet P-40含有トリスバッファー（1M CaCl_2 、20%グリセロール、および5 μ M EDTA含有25mM Tris/HCl、pH8.0）に懸濁し、再度遠心し、洗浄した。この洗浄操作を4回繰り返した後、DEAEセファロースをカラム（1.6×40cm、ファルマシア社製）に充填した。次いで、0.1%Nonidet P-40含有トリスバッファー（1M CaCl_2 、20%グリセロール、および5 μ M EDTA含有25mM Tris/HCl、pH8.0）を用いて、塩濃度0～0.35M NaClのグラディエントでパラオキシナーゼを溶出した。溶出フラクションは、各々10mlずつチューブに分取した。分取した各フラクションの蛋白濃度、およびパラオキシナーゼ活性を上掲のごとく測定した。その結果、フラクションNo. 40～No. 50の画分にパラオキシナーゼ活性が認められた（第2図）。このようにして得られたパラオキシナーゼ活性が認められる分画No. 40～No. 50のフラクションをまとめてパラオキシナーゼのDEAE I 分画とした。

【0063】上述のごとく得られたDEAE分画に、同等量の0.1%Nonidet P-40含有トリスバッファー（1M CaCl_2 、20%グリセロール、および5 μ M EDTA含有25mM Tris/HCl、pH8.0）を加えて混和し、カラム（1.0×10cm、ファルマシア社製）に充填した。次いで、0.1%Nonidet P-40含有トリスバッファー（1M CaCl_2 、20%グリセロール、および5 μ M EDTA含有25mM Tris/HCl、pH8.0）を用いて塩濃度0～0.35M NaClのグラディエントでパラオキシナーゼを溶出した。各分画のパラオキシナーゼ活性を上掲のごとく測定し、活性画分をDEAE II分画（精製パラオキシナーゼ）とした（第3図）。

【0064】パラオキシナーゼの性状

上述のごとく得られた精製パラオキシナーゼ（DEAE II分画）の蛋白濃度はBCA法（ピアース社製のキットによる）を用いて求めたところ、0.5mg/mlであった。さらに、精製パラオキシナーゼのパラオキシナーゼ活性、およびアリルエステラーゼ活性を上掲のごとく測定し、パラオキシナーゼ活性の比活性を求めたところ、4000nmol/min/mg、および1000 μ mol/min/mgであった。また、精製パラオキシナーゼの精製度は、10%ポリアクリルアミド電気泳動を行った後、ゲルを銀染色（第一化学社製）にて確認した。その結果、

精製パラオキシナーゼは分子量約46kDaの単一蛋白であることが認められ、Blatter-Garinら (Biochem J., 1994, 304: 549-554)、あるいはGanらの報告による分子量約45kDaとほぼ同一の結果であった(第4図)。

【0065】本発明ハイブリドーマの調製

上述の如く精製した精製パラオキシナーゼ(50 μ g/ml)を、等量のプロイント完全アジュバントと混和し、その0.4mlを7週齢のBalb/cマウス(雌、日本SLC社)の腹腔に免疫した。2週間後、プロイント不完全アジュバントを使用して同様に追加免疫を行い、それ以降は2週間に1回、計4回免疫した。

【0066】最終免疫3日後のマウスの脾細胞 4×10^8 個を、マウスミエローマ細胞(SP2/O-Ag14(4×10^7 個))と混和し、50%ポリエチレングリコール(平均分子量1500、ペーリンガー・マンハイム社製)PBS溶液を用いて細胞融合を行った。

【0067】処理後の細胞を、RPMI1640培地(ギブコ社製)中に、96ウェルプレートにウェル当たり 5×10^5 個の割合になるように播き、翌日からHAT試薬(シグマ社製)を添加し、7日間選択培養を行ったところ、ほぼ全ウェルにハイブリドーマの増殖が認められた。

【0068】各ハイブリドーマの培養上清中のヒトパラオキシナーゼに対して特異的なモノクローナル抗体の有無は、精製パラオキシナーゼを抗原としたELISA法でスクリーニングした。すなわち、精製パラオキシナーゼをウェル当たり50ngずつ固相化した96ウェルマイクロプレート(固定化精製ヒトパラオキシナーゼプレート)にハイブリドーマの培養上清を50 μ l添加し、室温下で2時間反応させた(一次反応)。次いで、プレートを0.1%Tween 20を含むPBSで6回洗浄した後、同PBSで4000倍に希釈したパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体(Zymed laboratories社製)を50 μ l加え、室温で1時間反応させた(二次反応)。反応後、プレートを上記PBSにて6回洗浄後、0.015%過酸化水素を含む0.25mg/ml OPD溶液(シグマ社製)を各ウェルに100 μ l加え、室温で30分間反応させた(基質反応)。反応後、さらに各ウェルに、2N硫酸を50 μ l加えて反応を停止した。そして、波長492nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(ラボシステム社製)で測定した。この結果、吸光度が1.0以上のハイブリドーマ培養上清を陽性とした。上記のスクリーニング方法で陽性であったハイブリドーマ培養上清について、さらにウエスタンブロット法でヒト血漿中のパラオキシナーゼとの反応性を確認し、上記精製パラオキシナーゼを抗原としたELISA法、およびヒト血漿のウエスタンブロット法にて特異性が認められたクローンを選別した。

【0069】このように特異性が認められたハイブリド

ーマについて、HT試薬(シグマ社製)を添加したRPMI1640培地において、96ウェルプレートに、ウェル当たり0.5個の細胞を播く操作を3回繰り返してクローニングし、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ(4C-1、5-10D)が得られた。なお、これらのハイブリドーマは、 Φ mouse hybridoma PON 4C-1(受託番号 FERM P-17385:以下、「4C-1」とも記載する)及び Φ mouse hybridoma PON5-10D(受託番号 FERM P-17386:以下、「5-10D」とも記載する)として、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

【0070】本発明モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体の大量精製

Balb/cマウス(雌、8週齢、10匹、日本SLC社)に、上述のようにして得られたハイブリドーマ(4C-1、5-10D、(各々 10^6 から 10^7 個/0.5ml/マウス))の各々を、腹腔内注射により導入した。導入10日後、マウスを麻酔下で開腹し、常法により採取した腹水からモノクローナル抗体(4C-1、5-10D)を大量に精製した。

【0071】アイソタイプの決定

マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定用キット(サングスタットメディカル社製)を用い、このキットに添付の実験操作プロトコールに従って操作を行い、モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)のアイソタイプを決定した。その結果、モノクローナル抗体4C-1のアイソタイプはIgG2bで、同5-10DはIgG1であった。

【0072】モノクローナル抗体の精製

上述のモノクローナル抗体(4C-1、5-10D)を含む腹水を各々遠心分離し、各々の上清(各5ml)に5mlの飽和硫酸アンモニウム溶液を加えて混和し、2時間氷冷にて放置した後、4℃、10000 \times gで10分間遠心した。遠心後、沈殿物をバインディングバッファー(3M塩化ナトリウム/1.5Mグリシン溶液、pH 8.9)に溶解し、プロテインAセファロース(ファルマシア社製)1mlと混和し、4℃で一晩転倒混和した。翌日、プロテインAセファロースをカラムに充填し、バインディングバッファー6mlで6回洗浄後、溶出バッファー(0.1Mクエン酸溶液、pH 4.0)2mlずつで溶出し、溶出回収した各々の溶液を、2Mトリス溶液(pH 10.0)0.2mlで中和した。各溶出フラクションの吸光度(波長280nm)を測定し、モノクローナル抗体の溶出画分を回収し、リン酸緩衝液(pH 7.4)にて透析(4℃、24時間)し、精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)を得た。

【0073】本発明モノクローナル抗体の性状解析

Φ ヒト血漿に対する反応性

上述のようにして得られた精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)のヒト血漿に対する反応性は、ヒ

ト血漿を用いたウエスタンブロット法で確認した。ヒト血漿試料は $0.5 \mu\text{l}$ /レーンの濃度で10% SDSポリアクリルアミドゲルを用いて、SDS-PAGE電気泳動を行った。次いで、ゲルをPVDF膜(ミリポア社製)に転写した。さらに、転写膜をブロッキング試薬(5%スキムミルク含有PBS、pH7.4)中にて4℃、一晚インキュベートした。次いで、転写膜を0.1% Tween 20含有PBS (pH7.4)で5回洗浄後、上記の0.1% Tween 20含有PBSで $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調製した各精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)を室温下で2時間反応させた。反応後、膜を0.1% Tween 20含有PBSで5回洗浄し、同0.1% Tween 20含有PBSで4000倍に希釈した2次抗体(HRP標識マウスIgG抗体: Zymed Laboratories社製)を室温で1時間反応させた。反応後、膜を同0.1% Tween 20含有PBSで5回洗浄し、ケミルミ試薬(NENライフサイエンスプロダクト社製)を1分間反応させた。次いで、ケミルミ試薬を取り除き、X線フィルムに感光後、フィルムを現像し反応バンドを検出した。この結果、各精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)のヒト血漿に対する反応性は、分子量約46kDaの蛋白と反応していることが確認された(第5図)。この結果は、Ganらが報告している血漿のパラオキシソナーゼの分子量約45kDaとほぼ同様の結果であり、各本発明精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)は、血漿中のパラオキシソナーゼを特異的に結合する抗体であることが示された。

【0074】² 精製パラオキシソナーゼに対する反応性
上述のようにして得られた精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)の精製パラオキシソナーゼに対する反応性は、ヒト血漿より精製した精製パラオキシソナーゼを用いたELISAで確認した。

【0075】上述のようにして得られた精製パラオキシソナーゼ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ を $50 \mu\text{l}$ /ウエルで96ウエルマイクロプレートに固相化した(精製パラオキシソナーゼ固相化プレート)。次いで、各ウエルの未反応の抗体を捨て、 $200 \mu\text{l}$ の5%スキムミルク含有PBS (pH7.4)を各ウエルに加えて室温で2時間反応させ、精製パラオキシソナーゼが固相されていない部分をブロックした。反応後、各ウエルに予めPBS (pH7.4)にて希釈した各精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)($0.001 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$)を $50 \mu\text{l}$ 加えて、室温で1時間反応させた。反応後、0.1% Tween 20含有PBS (pH7.4)で精製パラオキシソナーゼ固相化プレートを5回洗浄後、各ウエルに0.1% Tween 20含有PBSで4000倍に希釈した2次抗体(ビオチン標識マウスIgG抗体、ザイメッド社製)を $100 \mu\text{l}$ ずつ加えて、室温で2時間反応させた。反応後、0.1% Tween 20含有PBS (pH7.4)で精製パラオキシソナーゼ固相化プレートを5

回洗浄後、各ウエルに、0.1% Tween 20含有PBSで2000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン($1 \text{mg}/\text{ml}$ 、Vector Laboratories社製) $100 \mu\text{l}$ 加え、室温下で30分間反応させた。反応後、精製パラオキシソナーゼ固相化プレートを0.1% Tween 20含有PBS (pH7.4)で5回洗浄後、各ウエルに0.015%過酸化水素を含む $0.25 \text{mg}/\text{ml}$ OPD (シグマ社製)溶液を $100 \mu\text{l}$ 加え、室温で30分間反応させた。さらに、精製パラオキシソナーゼ固相化プレートの各ウエルに2N硫酸 $50 \mu\text{l}$ 加えて、反応を停止した。そして、波長492nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(ラボシステム社製)で測定した。

【0076】この結果、本発明精製モノクローナル抗体4C-1、5-10Dは $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の精製パラオキシソナーゼに対して、それぞれ $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の力価で反応することが示された(第6図)。

【0077】サンドイッチELISAによるヒトパラオキシソナーゼの定量系の確立

固相化モノクローナル抗体の調製

上記の各精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D)を、PBS溶液で希釈($10 \text{ng}/\text{ml} \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$)し、これらの各々希釈モノクローナル抗体溶液 $100 \mu\text{l}$ を96ウエルマイクロプレートの各ウエルに加え、4℃で24時間インキュベートし、各々のモノクローナル抗体をマイクロプレートに吸着させた。次いで、各ウエルを $200 \mu\text{l}$ のPBSで4回洗浄した。この洗浄液を捨て、各ウエルに $200 \mu\text{l}$ のブロッキング試薬(1% ブロックエース粉末(大日本製薬社製)含有PBS、pH7.4)を加え、室温で2時間インキュベートし、モノクローナル抗体が結合していない部位をブロックした。次いで、各ウエルを $200 \mu\text{l}$ の0.1% Tween 20含有PBSで4回洗浄した。このようにして所望する固相化モノクローナル抗体プレートを作製した。

【0078】精製モノクローナル抗体の標識

上記の各精製モノクローナル抗体(4C-1、5-10D、 $1 \text{mg}/\text{ml}$)を 0.1M NaHCO₃ (pH8.2~8.3)溶液で透析(4℃、24時間)した。次いで、NHS-ビオチン($1 \text{mg}/\text{ml}$ を $60 \mu\text{l}$ 、ピアース社製)を加えて激しく攪拌した後、室温下で4時間インキュベートした。次いで、PBS (pH7.4)で透析(4℃、24時間)して、各々のモノクローナル抗体において、所望するビオチン標識モノクローナル抗体(以下、標識モノクローナル抗体という)を調製した。このように調製した標識モノクローナル抗体の精製パラオキシソナーゼに対する反応性を、上述の固定化精製パラオキシソナーゼマイクロプレートで、同様に検討した。その結果、各々の標識モノクローナル抗体4C-1、および5-10Dは、 $0.01 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、固定化精製パラオキシソナーゼ(100ng)に反応することが

示された(第7図)。

【0079】サンドイッチELISAによる定量法の確立。

上記の各固定化モノクローナル抗体(4C-1、5-10D、500ng/ウエル〜0.5μg/ウエルの濃度で固定化した。以下、「固定化マイクロプレート」ともいう。)の各々を0.1%Tween 20含有PBSで5回洗浄した。各々の固定化マイクロプレートの各ウエルに、0.1%Tween 20含有PBSで予め希釈した測定試料(精製パラオキシナーゼ、および健康人血清)を100μl 加え、室温で2時間インキュベートした。インキュベート後、固定化マイクロプレートを0.1%Tween 20含有PBSで5回洗浄した後、各ウエルに0.1%Tween 20含有PBSで希釈した、上記のビオチン標識モノクローナル抗体を加え(0.5μg/mlを100μl)、室温で2時間インキュベートした。次いで、固定化マイクロプレートを0.1%Tween 20含有PBSで5回洗浄後、0.1%Tween 20含有PBS2000倍に希釈したHRP標識ストレプトアビジン(1mg/ml、Vector Laboratories 社製)の100μlを各ウエルに加え、室温で、30分間インキュベートした。インキュベート後、固定化マイクロプレートを0.1%Tween 20含有PBSで5回洗浄した後、固定化マイクロプレートの各ウエルに0.015%過酸化水素を含む0.25mg/ml OPD(シグマ社製)溶液を100μl 加え、室温で30分間インキュベートした。さらに、固定化マイクロプレートの各ウエルに、50μl の2N硫酸を加えて、反応を停止した。そして、波長492nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【0080】このような、サンドイッチELISAによる測定試料中のパラオキシナーゼ測定では、実施例で示したように、健康人の血清や精製パラオキシナーゼを濃度依存的に測定がなされており、本発明のサンドイッチELISAによる測定試料中のパラオキシナーゼ量を定量することが十分に可能であることが示された(第8図)。

【0081】この結果、標識モノクローナル抗体および固定化モノクローナル抗体の組み合わせのうち、特に固定化モノクローナル抗体は5-10Dと標識モノクローナル抗体4C-1との組み合わせにより、測定試料中のパラオキシナーゼ量を測定することが望ましい。

【0082】また、このような測定試料中のパラオキシナーゼを測定するのに最適な固定化モノクローナル抗体および標識モノクローナル抗体の濃度は、固定化モノクローナル抗体の濃度が250ng/ウエルであり、標識モノクローナル抗体の濃度が150ng/ウエルであることが上記の実施例より示された。

【0083】測定試料の希釈。

上述のごとく確立された本発明モノクローナル抗体を用

いたサンドイッチELISAによる測定において、測定試料を血清等のリポタンパクに結合したパラオキシナーゼを測定する場合、脂質という疎水性の性状を有するリポタンパク質と結合しており、測定試料中のパラオキシナーゼ量を正確に捉えることが不可能な場合が想定される。このような状況を鑑み、測定試料に血清を用いた際の、試料希釈に用いる希釈液の組成について検討を加えた。すなわち、上述のごとく確立されたサンドイッチELISAによるパラオキシナーゼの測定において、血清試料を試料希釈液としてPBS、0.1%Tween 20含有PBS、0.1%Triton含有PBS、0.1%CHAPS含有PBSで、10倍から10000倍に希釈した際の血清試料中のパラオキシナーゼ量を測定した。その結果、どの希釈液においても精製パラオキシナーゼと同様のカーブを示していた(第9図)。中でも、0.1%CHAPS含有PBSを血清試料を用いる場合に、吸光度が高く得られることより、以後の血清パラオキシナーゼの蛋白定量は同希釈液を用いることとした。

【0084】血清試料におけるパラオキシナーゼ量。健康人66名、および少なくともカルジオアングログラフィーで冠動脈の1枝以上に、軽度以上の狭窄が認められた冠動脈疾患を患った患者(以下、CHDという)51名の血清を用いてパラオキシナーゼ活性、アリルエステラーゼ活性、パラオキシナーゼ蛋白量、および各個人の192番目のアミノ酸における多型性について解析を行った。パラオキシナーゼ多型性の解析は下記に示した方法で行った。

【0085】パラオキシナーゼ多型性解析。

ゲノムDNAは末梢白血球からキアゲンブラッドキット(キアゲン社製)を用いて抽出した。パラオキシナーゼの192番目のアミノ酸の置換はHumbertらの方法(Nature Genet, 3:73-76, 1993)に準じてPCR-RFLP法にて行った。すなわち、センスプライマー(配列番号1: 5'-tattgttgctgtgggacctgag)、およびアンチセンスプライマー(配列番号2: 5'-cttgccatcggtgaaatgttg)を用いて、0.5μgのゲノムDNAをPCR増幅(denature: 94℃ 20秒、annealing: 60℃ 30秒、extension: 72℃ 90秒、30サイクル)し、193bpのPCR産物は3%アガロース電気泳動で確認した。泳動後、PCR産物の確認はエチジウムブロマイド染色を行い同定した。さらに、このPCR産物20μlを1UのAlw1制限酵素にて消化し(37℃、16時間)、消化後反応液を3%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後、エチジウムブロマイド染色して、PCR産物のAlw1制限酵素による消化パターンを判別した。その結果を、第1表に示す。

【0086】

【表1】

第 1 表

検査	コントロール群		CHD患者群	
	AA	AB	BB	BB
n (M/F)	8 (5/3)	25 (17/8)	33 (19/14)	21 (14/7)
パラオキシナーゼ活性 (nmol/min/ml)	184.2 ± 29.5	553.5 ± 88.9	958.9 ± 184.7	782.9 ± 198.5 ***
アシルエステラーゼ活性 (μmol/min/ml)	154.4 ± 24.2	133.5 ± 28.4	113.1 ± 19.6	93.1 ± 24.6 **
パラオキシナーゼ蛋白量(μg/ml)	144.1 ± 38.8	128.4 ± 36.6	112.1 ± 29.9	82.5 ± 26.9 ***
パラオキシナーゼ特異性 (nmol/min/μg)	1.31 ± 0.20	4.52 ± 0.97	8.80 ± 1.36	9.45 ± 0.97 **
アシルエステラーゼ特異性 (μmol/min/μg)	1.10 ± 0.16	1.07 ± 0.20	1.04 ± 0.17	1.15 ± 0.13 *

コントロール群に対する有意差 *P<0.05; **P<0.005; ***P<0.001

【0087】第1表に示す通り、健康人66名における各パラオキシナーゼ多型性のタイプ別のパラオキシナーゼ活性、アシルエステラーゼ活性、パラオキシナーゼ蛋白量はそれぞれ、AAタイプ: n=8、パラオキシナーゼ活性184.2 ± 29.5, 5nmole /min /ml、アシルエステラーゼ活性154.4 ± 24.2, 2 μmol /min /ml、パラオキシナーゼ蛋白量144.1 ± 39.8, 8 μg

/ml、ABタイプ: n=25、パラオキシナーゼ活性553.5 ± 88.9, 9nmole /min /ml、アシルエステラーゼ活性133.5 ± 26.4 μmol /min /ml、パラオキシナーゼ蛋白量128.4 ± 36.6 μg /ml、BBタイプ: n=33、パラオキシナーゼ活性958.9 ± 184.7, 7nmole /min /ml、アシルエステラーゼ活性113.1 ± 19.6 μmol /min /ml、パラオキシナーゼ蛋白量112.1 ± 29.9 μg /mlであった。

【0088】CHD患者51名ではそれぞれ、AAタイプ: n=6、パラオキシナーゼ活性156.4 ± 64.9, 9nmole /min /ml、アシルエステラーゼ活性131.2 ± 45.9, 9 μmol /min /ml、パラオキシナーゼ蛋白量98.1 ± 37.7, 7 μg /ml、ABタイプ: n=24、パラオキシナーゼ活性536.3 ± 177.9, 9nmole /min /ml、アシルエステラーゼ活性113.1 ± 19.6 μmol /min /ml、パラオキシナーゼ蛋白量112.1 ± 29.9 μg /ml、BBタイプ: n=21、パラオキシナーゼ活性782.9 ± 198.5, 5nmole /min /ml、アシルエステラーゼ活性93.1 ± 24.6, 9 μg /mlであった。

【0089】また、健康者をコントロールとした場合のCHD患者での各々の測定結果について不等分散による検定を実施し有意差を検討したところ、パラオキシナーゼ活性はBBタイプにおいてp<0.01、アシルエステラーゼ活性は同じくBBタイプにおいてp<0.01、パラオキシナーゼ蛋白量はAAタイプがp<0.05、BBタイプがp<0.01と有意に低下していることが認められた。すなわち、健康人よりCHD患者においてパラオキシナーゼ活性、アシルエステラーゼ活性、パラオキシナーゼ蛋白量のいずれもが低値であり、とりわけパラオキシナーゼ蛋白量は低値であることが示された。

【0090】過酷な酸化ストレスの結果生じたと考えられるCHD患者において、抗酸化的に作用するパラオキシナーゼが消費され、その結果パラオキシナーゼ活性をはじめ、アシルエステラーゼ活性、パラオキシナーゼ蛋白量のいずれもが低値を示したと考えられる。

【0091】このように、パラオキシナーゼの活性ないし蛋白量が、CHDないし動脈硬化症のマーカーとなり得ることが示された。以上のように、CHD患者においては、パラオキシナーゼが量的に減少する傾向が強いことが明らかになった。よって、検体におけるパラオキシナーゼの活性を、全体量として把握することで、これを動脈硬化の一次的な指標にすることが可能である。

【0092】さらに、本試験では、驚くべきことに、パラオキシナーゼの質的な変化にも着目することにより、より詳細な動脈硬化の判定をすることが可能であることが明らかになった。

【0093】CHD患者群においては、低HDLコレス

テロール血症を呈する例が、かなりの頻度で観察され、この低HDLコレステロール血症であるということも、動脈硬化のリスクファクターの一つとして知られている。しかしながら、低HDLコレステロール血症であるということが、必ずしも確度の高い動脈硬化の指標であるとはいえない面もあることも、また事実である。低HDLコレステロール血症であるということは、少なくとも動脈硬化を惹き起こす素因が存在することを示しているが、現に、動脈硬化が進展していることを、直接的に反映していないことも想定される。

【0094】低HDLコレステロール血症である場合に、HDL結合性蛋白質であるパラオキシナーゼの量は、HDL量が低下するのと相関して、低値を示す。この時点で、ある程度の動脈硬化のリスクについての知見を得ることができるが、さらに、パラオキシナーゼの質的な変化を検出することにより、より突っ込んだ動脈硬化についての知見を得ることができるはずである。

【0095】パラオキシナーゼの質的な変化は、パラオキシナーゼの単位当りの酵素活性の変化を検出することにより特定され得る。つまり、パラオキシナーゼの質的な変化は、パラオキシナーゼ活性を蛋白量当りに換算した「特異活性」を求めることにより評価することが可能である。

【0096】低HDLコレステロール血症であるものの、動脈硬化が現にそれほど亢進していない場合、パラオキシナーゼの特異活性は、健常人の同特異活性とは差異が認められないが、動脈硬化が現に亢進している場合には、パラオキシナーゼにおいて質的な変化が認められることが考えられる。

【0097】上述のパラオキシナーゼの質的な変化について検討した本試験の結果を、ここに示す。第1表に示

したごとく、パラオキシナーゼ特異活性及びアシルエステラーゼ特異活性は、健常人コントロールと比較すると、CHD患者群のパラオキシナーゼ特異活性が、AAタイプが $p < 0.01$ 、BBタイプが $p < 0.05$ 、同アシルエステラーゼ特異活性が、AAタイプが $p < 0.005$ 、ABタイプ及びBBタイプが $p < 0.01$ と、有意差をもって高値であることが示された。このことから、CHD患者群においては、パラオキシナーゼの量的な異常ばかりではなく、質的な異常が認められることが明らかとなった。

【0098】よって、パラオキシナーゼ特異活性及びアシルエステラーゼ特異活性について検討して、パラオキシナーゼの質的な異常を検出することにより、より詳細な動脈硬化ないしCHDについての指標を得ることが可能であることが裏付けられた。

【0099】上述のように、動脈硬化ないしCHDにおいて、パラオキシナーゼ特異活性が向上することは、これらの疾患に際しての生体内における酸化反応の亢進により、パラオキシナーゼが防御的に働いて消費され、生体内でのパラオキシナーゼの分解及び産生の代謝が亢進していることによるものと考えられる。

【0100】以上、本発明検出方法により検出された検体中のパラオキシナーゼの量的・質的な異常により、検体提供者の動脈硬化を判定することが可能であることが明らかになった。

【0101】

【発明の効果】本発明により、パラオキシナーゼに対するモノクローナル抗体及びこれを用いた動脈硬化の判定方法が提供される。

【0102】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<110> BML, INC.
<120> Monoclonal antibody against paraoxonase
<130> PBM36
<140>
<141>
<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: pcr primer
<400> 1
tattgttgct gtggacctg ag
<210> 2
```

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:pcr primer
 <400> 2
 cttgccatcg ggtgaaatgt tg

22

【図面の簡単な説明】

【図1】ブルーアガロースクロマトグラフィーによるパラオキシナーゼの精製について示した図面である。

【図2】陰イオン交換クロマトグラフィー（DEAE I）によるパラオキシナーゼの精製について示した図面である。

【図3】陰イオン交換クロマトグラフィー（DEAE I）によるパラオキシナーゼの精製について示した図面である。

【図4】精製パラオキシナーゼの銀染色像を示した図面である。

【図5】精製モノクローナル抗体の血漿に対する反応性

を示した図面である。

【図6】精製モノクローナル抗体の精製パラオキシナーゼに対する反応性を、ELISA法で検討した結果を示した図面である。

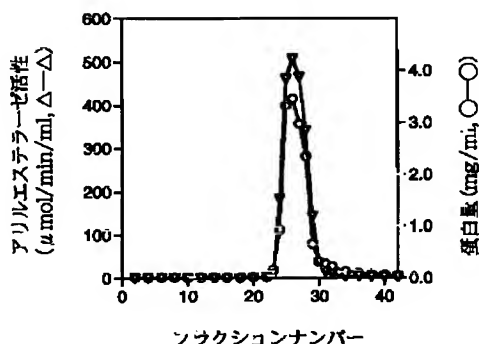
【図7】標識精製モノクローナル抗体の精製パラオキシナーゼに対する反応性を、ELISA法で検討した結果を示した図面である。

【図8】本発明検出法における検量線の直線性を、精製パラオキシナーゼを用いて検討した結果を示した図面である。

【図9】本発明検出法を用いて、検体希釈液のパラオキシナーゼを検出した結果を示した図面である。

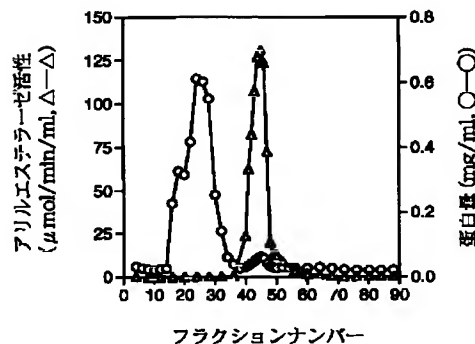
【図1】

第 1 図



【図2】

第 2 図

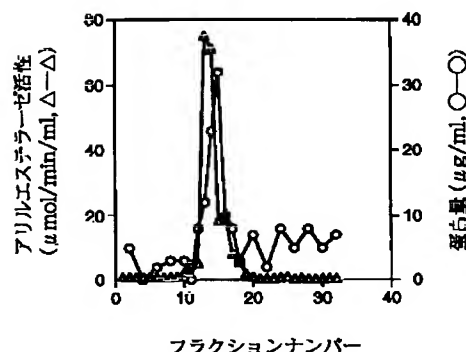
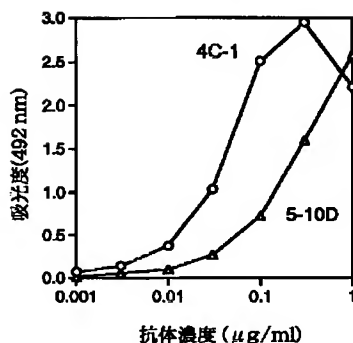


【図3】

第 3 図

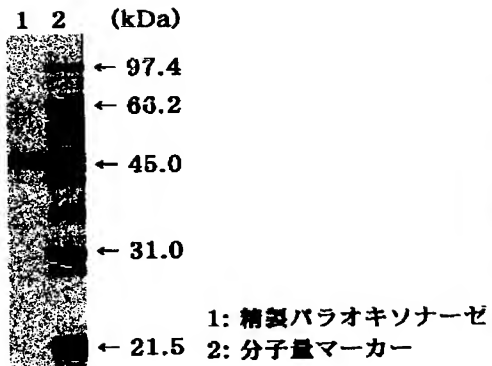
【図7】

第 7 図



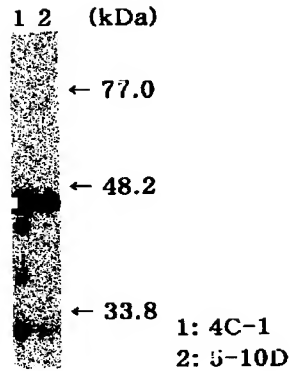
【図4】

第 4 図



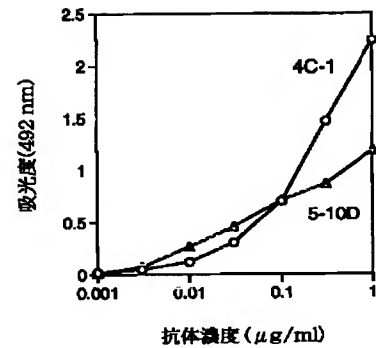
【図5】

第 5 図



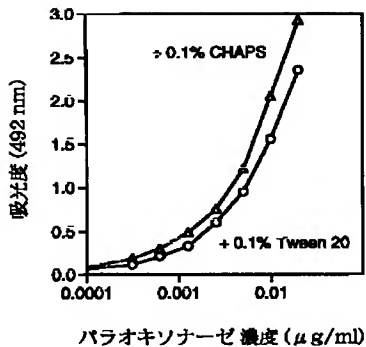
【図6】

第 6 図



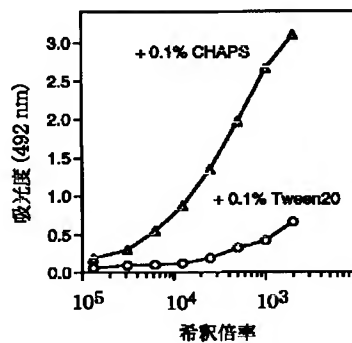
【図8】

第 8 図



【図9】

第 9 図



フロントページの続き

(72)発明者 岡 智一郎
埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビ
ー・エム・エル総合研究所内
(72)発明者 岩崎 忠雄
埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビ
ー・エム・エル総合研究所内
(72)発明者 石原 光昭
埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビ
ー・エム・エル総合研究所内

(72)発明者 江頭 徹
埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビ
ー・エム・エル総合研究所内
Fターム(参考) 4B024 BA44 DA02 GA03 HA15
4B065 AA92X AB05 AC14 BA08
CA25 CA46
4H045 AA11 AA30 BA10 CA42 DA76
DA86 EA55